



| | | |
|--|-----------|--|
| <p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C07D 493/04, C12P 17/18 A01N 43/90, A61K 31/425 // (C07D 493/04, 313:00, 303:00) (C12P 17/18, C12R 1:00)</p> | A1 | <p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/10121</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. Mai 1993 (27.05.93)</p> |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/02656</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 19. November 1992 (19.11.92)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 41 38 042.8 19. November 1991 (19.11.91) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE). CIBA-GEIGY AG [CH/CH]; Klybeckstr. 141, CH-4002 Basel (CH).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : HÖFLE, Gerhard [DE/DE]; BEDORF, Norbert [DE/DE]; GERTH, Klaus [DE/DE]; REICHENBACH, Hans [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw. ; Bereiteranger 15, D-8000 München 90 (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, FI, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p> </div> </div> | | |
| <p>(54) Title: EPOTHILONES, PROCESS FOR PREPARING THE SAME AND THEIR USE AS MEDICAMENTS AND AS PLANT PROTECTING AGENTS</p> <p>(54) Bezeichnung: EPOTHILONE, DEREN HERSTELLUNGSVERFAHREN UND IHRE VERWENDUNG ALS ARZNEIMITTEL UND PFLANZENSCHÜTZENDE MITTEL</p> | | |
| | | |
| <p>(57) Abstract</p> <p style="text-align: center;">Epothilones having general formula (I), a process for preparing the same and epothilone-containing agents are disclosed.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p style="text-align: center;">Die Erfindung betrifft Epothilone der allgemeinen Formel (I). Herstellungsverfahren sowie Epothilone enthaltende Mittel.</p> | | |

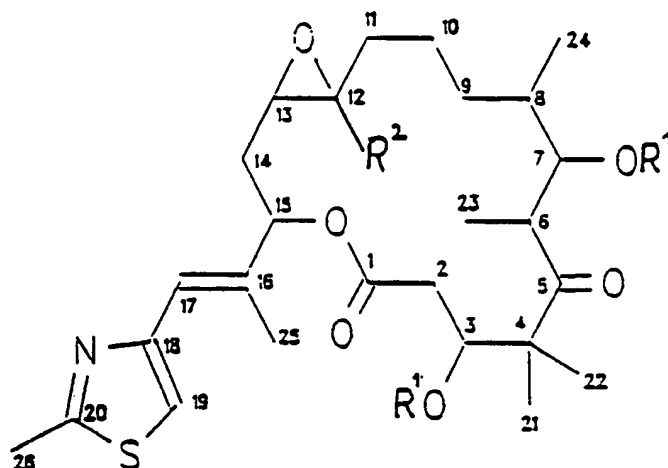
LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfhögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AT | Österreich | FR | Frankreich | MR | Mauritanien |
| AU | Australien | GA | Gabon | MW | Malawi |
| BB | Barbados | GB | Vereinigtes Königreich | NL | Niederlande |
| BE | Belgien | GN | Guinea | NO | Norwegen |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | NZ | Neuseeland |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | PL | Polen |
| BJ | Benin | IE | Irland | PT | Portugal |
| BR | Brasilien | IT | Italien | RO | Rumänien |
| CA | Kanada | JP | Japan | RU | Russische Föderation |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SD | Sudan |
| CG | Kongo | KR | Republik Korea | SE | Schweden |
| CH | Schweiz | KZ | Kasachstan | SK | Slowakische Republik |
| CI | Côte d'Ivoire | LI | Liechtenstein | SN | Senegal |
| CM | Kamerun | LK | Sri Lanka | SU | Sowjet Union |
| CS | Tschechoslowakei | LU | Luxemburg | TD | Tschad |
| CZ | Tschechische Republik | MC | Monaco | TG | Togo |
| DE | Deutschland | MG | Madagaskar | UA | Ukraine |
| DK | Dänemark | ML | Mali | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| ES | Spanien | MN | Mongolei | VN | Vietnam |
| FI | Finnland | | | | |

EPOTHILONE, DEREN HERSTELLUNGSVERFAHREN UND IHRE VERWENDUNG ALS ARZNEIMITTEL UND PFLANZENSCHUTZENDE MITTEL

Die Erfindung betrifft Epothilone der folgenden allgemeinen Formel:



worin R¹ Wasserstoff, C₁-C₄-Alkyl, C₁-C₄-Alkanoyl, Li⁺, K⁺, Na⁺, 1/2 Mg²⁺ oder 1/2 Ca²⁺ bedeutet und R² Wasserstoff oder eine Methylgruppe darstellt.

Ferner betrifft die Erfindung ein Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

- 2 -

| ¹ H-NMR-Daten | | | ¹³ C-NMR-Daten | |
|--------------------------|------|-----|---------------------------|-------|
| Atom | | | Atom | |
| 2a | 2,4 | dd | 1 | 170,5 |
| 2b | 2,52 | dd | 2 | 39,1 |
| 3 | 4,19 | dd | 3 | 73,2 |
| 6 | 3,2 | m | 4 | 53,0 |
| 7 | 3,78 | dd | 5 | 219,9 |
| 8 | 1,73 | m | 6 | 43,5 |
| 9a | 1,4 | m | 7 | 74,7 |
| 9b | 1,52 | m | 8 | 36,4 |
| 10a | 1,4 | m | 9 | 30,7 |
| 10b | 1,4 | m | 10 | 23,6 |
| 11a | 1,42 | m | 11 | 27,6 |
| 11b | 1,7 | m | 12 | 57,4 |
| 12 | 2,9 | ddd | 13 | 54,6 |
| 13 | 3,01 | ddd | 14 | 31,7 |
| 14a | 1,85 | ddd | 15 | 76,8 |
| 14b | 2,11 | ddd | 16 | 137,4 |
| 15 | 5,41 | dd | 17 | 120,1 |
| 17 | 6,6 | s | 18 | 152,1 |
| 19 | 6,99 | s | 19 | 116,3 |
| 21* | 1,08 | s | 20 | 165,0 |
| 22* | 1,35 | s | 21* | 20,4 |
| 23 | 1,15 | d | 22* | 21,6 |
| 24 | 0,93 | d | 23 | 14,1 |
| 25 | 2,05 | s | 24 | 17,1 |
| 26 | 2,69 | s | 25 | 15,6 |
| | | | 26 | 19,1 |

*) Zuordnung vertauschbar

$C_{26}H_{39}NO_6S$ [493]

FAB-MS (neg. Ionen): 492.25 für $(M - H)^-$

UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:

ν : 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979 cm^{-1}

DC: $R_F = 0,75$

DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm
2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120 °C,
braune Anfärbung

HPLC: $R_t = 5,4$ min

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7 μm , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

Des weiteren betrifft die Erfindung ein Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

| ¹ H-NMR-Daten | | | ¹³ C-NMR-Daten | |
|--------------------------|------|-----|---------------------------|--|
| Atom | | | Atom | |
| 2a | 2,22 | dd | 1 | 170,5 |
| 2b | 2,53 | dd | 2 | 39,4 |
| 3 | 4,24 | dd | 3 | 72,9 |
| 6 | 3,28 | m | 4 | 53,2 |
| 7 | 3,75 | dd | 5 | 219,8 |
| 8 | 1,73 | m | 6 | 43,1 |
| 9a | 1,4 | m | 7 | 74,3 |
| 9b | 1,5 | m | 8 | 36,6 |
| 10a | 1,4 | m | 9 | 30,9 |
| 10b | 1,4 | m | 10 | 22,5 |
| 11a | 1,42 | m | 11 | 32,3 |
| 11b | 1,7 | m | 12 | 61,3 |
| 12 | - | | 13 | 61,7 |
| 13 | 2,8 | dd | 14 | 32,4 |
| 14a | 1,9 | ddd | 15 | 76,9 |
| 14b | 2,1 | ddd | 16 | 137,5 |
| 15 | 5,41 | dd | 17 | 120,0 |
| 17 | 6,6 | s | 18 | 152,1 |
| 19 | 6,99 | s | 19 | 116,2 |
| 21* | 1,05 | s | 20 | 165,1 |
| 22* | 1,36 | s | 21* | 19,7 |
| 23 | 1,15 | d | 22* | 21,5 |
| 24 | 0,92 | d | 23 | 13,7 |
| 25 | 2,05 | s | 24 | 17,2 |
| 26 | 2,69 | s | 25 | 15,7 |
| 27 | 1,28 | s | 26 | 19,0 (R ¹ = CH ₃) |

*) Zuordnung vertauschbar

- 5 -

 $C_{27}H_{41}NO_6S$ [507]FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für $(M - H)^-$ UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Intran:

 ν = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977 cm^{-1} DC: R_F = 0,75DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

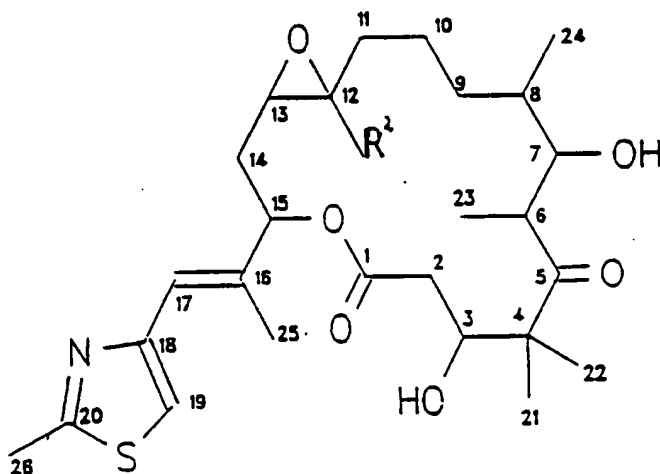
Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm
 2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120 °C,
 braune Anfärbung

HPLC: R_t = 6,3 minSäule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7 μm , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

Besonders bevorzugt sind Epothilone mit der folgenden Strukturformel:



worin R² Wasserstoff oder Methyl bedeutet. (Das Kohlenstoffatom der Methylgruppe wird als C27 bezeichnet). Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Gewinnen von Epothilonen, insbesondere der vorstehend charakterisierten Epothilone, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man den Stamm So ce90 DSM 6773

- in einem Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen und Mineralsalze enthaltenden Medium kultiviert,
- entweder während der Kultivierung des Stammes oder anschließend ein Adsorberharz zusetzt,
- die Fermenterbrühe abtrennt,
- die Epothilone aus dem Adsorberharz eluiert und
- die Eluate direkt oder über weitere Reinigungsschritte von dem/den Lösungsmittel(n) befreit,
- und gegebenenfalls über Hochdruck/Niederdruckchromatographie und/oder Umkristallisation die verschiedenen Epothilone aufreinigt und voneinander trennt.

Gegebenenfalls können die so gewonnenen Epothilone mit gängigen chemischen Verfahren weiter umgesetzt werden, z.B. mit Basen in die Alkali- und Erdalkalisalze überführt und gegebenenfalls weiter zu Ethern umgesetzt werden, oder sie können mit organischen Säuren in die entsprechenden Ester überführt werden.

Ferner betrifft die Erfindung ein Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone oder eines oder mehrere dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung ein therapeutisches Mittel, das insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken kann, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone oder eines oder mehrere dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

- Administrationsform: oral
- Dosis 0.5 bis 200 mg für einen Menschen mit 70 kg Normalgewicht
- Verwendungszweck: Antitumor

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen und experimentellen Daten näher erläutert.

Produktionsstamm

Stamm So ce90 wurde im Juli 1985 an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) aus einer Bodenprobe von den Ufern des Zambesi, im südlichen Afrika, isoliert. Der Stamm ist bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) unter Nr. 6773 hinterlegt.

Stammkultur und morphologische Beschreibung: Der Stamm wächst auf Cellulose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle mit KNO_3 als einzige Stickstoffquelle, z.B. auf Filterpapier über ST21 Mineralsalzagar (0.1% KNO_3 ; 0.1% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 0.1% $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; 0.1% K_2HPO_4 ; 0.01% $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 0.02% FeCl_3 ; 0.002% Hefeextrakt; Standard-Spurenelementlösung; 1% Agar). Auf diesem Medium werden dunkelrotbraune bis schwarzbraune Fruchtkörper gebildet, bestehend aus kleinen Sporangiolen (etwa 15 bis 30 μm Durchmesser) in mehr oder weniger großen dichten Haufen und Paketen.

Der Stamm wächst sehr gut mit Glucose und KNO_3 , z.B. auf CA2-Agar (Grundmedium: 1.5 g Agar in 92 ml Aqua dest.; Stammlösung 1: 7.5% KNO_3 , 7.5% K_2HPO_4 in Aqua dest.; Stammlösung 2: 1.5% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ in Aqua dest.; Stammlösung 3: 0.2% $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 0.15% FeCl_3 in Aqua dest.; Stammlösung 4: 20% Glucose in Aqua dest. Die Stammlösungen werden durch Autoklavieren sterilisiert. Je 1 ml der Lösungen 1 bis 3, sowie 5 ml der Lösung 4 werden dem Grundmedium zugegeben, ebenso eine geeignete Menge einer Spurenelementlösung).

Die vegetativen Stäbchen haben die für *Sorangium* typische Form (relativ derbe, im Phasenkontrastmikroskop dunkle, zylindrische Stäbchen mit breit abgerundeten Enden, im Mittel 3 - 6 µm lang und 1 µm dick). Nach längerer Adaptation an das Wachstum in Flüssigmedien wächst der Stamm in homogener Zellsuspension.

Der Stamm So ce90 produziert chemisch nahe verwandte Verbindungen, die antibiotische Aktivität besitzen. Insbesondere sind diese Verbindungen cytotoxisch sowie antifungal wirksam. Hervorzuheben ist z.B. die Hemmung von *Mucor hiemalis*.

Produktion der biologisch aktiven Verbindungen:

Die Verbindungen werden während der logarithmischen bis hin zur stationären Wachstumsphase produziert. Eine typische Fermentation verläuft folgendermaßen: Ein 100 l-Fermenter wird mit 60 l Medium (0.8% Stärke; 0.2% Glucose; 0.2% Soyamehl; 0.2% Hefeextrakt; 0.1% $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 0.1% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 8 mg/l Fe-EDTA; pH 7.4) gefüllt. Beimpft wird mit 10 l einer im gleichen Medium jedoch zusätzlich mit 50 mM HEPES-Puffer pH 7.4 in Schüttelkolben angezogenen Vorkultur (160 upm, 30 °C). Fermentiert wird bei 32 °C mit einer Rührgeschwindigkeit von 500 upm und einer Belüftung von 0.2. NL pro m³ und Std, der pH Wert wird durch Zugabe von KOH bei 7.4 gehalten. Die Fermentation dauert 7 - 10 Tage. Die gebildeten aktiven Verbindungen befinden sich teils im Überstand und teils in den Zellen.

Alternativ dazu kann in Gegenwart von Adsorberharzen (z.B. XAD-1180, Rohm und Haas, 2 - 5 %) fermentiert werden.

Isolierung von Epothilon A und B

Während der Fermentation von *Sorangium cellulosum* So ce90 (z.B. 70 l Fermentationsvolumen) in Gegenwart eines Adsorberharzes (z.B.: XAD-1180, Röhm und Haas, 2 % v/v) werden die gebildeten Antibiotika Epothilon A (Abb. 1) und B (Abb. 2) vollständig an das Harz gebunden. Nach Abtrennung der Kulturbrühe (z.B. durch Absieben in einem Prozeßfilter) wird das Harz mit 3 Bettvolumen Wasser gewaschen und mit 4 Bettvolumen Methanol eluiert. Die vereinigten Eluate werden im Vakuum bis auf den Wassergehalt eingengt und dreimal mit je 0.2 l Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatextrakte werden zur Trockne eingengt (ca. 40 g Trockengewicht).

Der Rohextrakt wird in 50 ml Methanol aufgenommen und an Lichroprep RP-18 25-40 μm (Säule: 400 x 100 mm; Fluß: 200 ml/min; Merck Prepbar) isokratisch mit Methanol/Wasser 6/4 chromatographiert. Die Epothilone enthaltenden Fraktionen (R_f ca. 95 - 125 min) werden durch RP-18 Niederdruckchromatographie aufgereinigt. (Säule 400 x 60; HD-Sil-18-20-60, Labomatic; Laufmittel: Methanol/Wasser 65/35; Fluß 25 ml/min; R_f Epothilon A: 140 - 165 min; R_f Epothilon B: 170 - 195 min).

Die Feinreinigung der Epothilone erfolgt durch Kristallisation aus

1. Epothilon A: Toluol/Ethylacetat = 3 : 2
2. Epothilon B: Ethylacetat

Epothilon A

$\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{NO}_6\text{S}$ [493]

FAB-MS (neg. Ionen): 492.25 für $(\text{M} - \text{H})^-$

^1H -NMR-Daten s. Tab. 1

^{13}C -NMR-Daten s. Tab. 2

UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:

ν : 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979 cm^{-1}

DC: R_F = 0,75

DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm
2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120 °C, braune Anfärbung

HPLC: R_t = 5,4 min

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7 μm , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

Epothilon B $C_{27}H_{41}NO_6S$ [507]FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für $(M - H)^-$ 1H -NMR-Daten s. Tab. 1 ^{13}C -NMR-Daten s. Tab. 2UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Intran:

 ν = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977 cm^{-1} DC: R_F = 0,75DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120 °C,
braune AnfärbungHPLC: R_t = 6,3 minSäule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7 μm , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

Tabelle 1

| ¹ H-NMR-Daten der Epothilone A und B | | | | |
|---|------|-----|------|-----|
| Atom | A | | B | |
| 2a | 2,4 | dd | 2,22 | dd |
| 2b | 2,52 | dd | 2,53 | dd |
| 3 | 4,19 | dd | 4,24 | dd |
| 6 | 3,2 | m | 3,28 | m |
| 7 | 3,78 | dd | 3,75 | dd |
| 8 | 1,73 | m | 1,73 | m |
| 9a | 1,4 | m | 1,4 | m |
| 9b | 1,52 | m | 1,5 | m |
| 10a | 1,4 | m | 1,4 | m |
| 10b | 1,4 | m | 1,4 | m |
| 11a | 1,42 | m | 1,42 | m |
| 11b | 1,7 | m | 1,7 | m |
| 12 | 2,9 | ddd | - | |
| 13 | 3,01 | ddd | 2,8 | dd |
| 14a | 1,85 | ddd | 1,9 | ddd |
| 14b | 2,11 | ddd | 2,1 | ddd |
| 15 | 5,41 | dd | 5,41 | dd |
| 17 | 6,6 | s | 6,6 | s |
| 19 | 6,99 | s | 6,99 | s |
| 21 | 1,08 | s | 1,05 | s |
| 22 | 1,35 | s | 1,36 | s |
| 23 | 1,15 | d | 1,15 | d |
| 24 | 0,93 | d | 0,92 | d |
| 25 | 2,05 | s | 2,05 | s |
| 26 | 2,69 | s | 2,69 | s |
| | | | 1,28 | s |

*) Zuordnung vertauschbar

Tabelle 2

| ¹³ C-NMR-Daten der Epothilone A und B | | |
|--|-------|-------|
| Atom | A | B |
| 1 | 170,5 | 170,5 |
| 2 | 39,1 | 39,4 |
| 3 | 73,2 | 72,9 |
| 4 | 53,0 | 53,2 |
| 5 | 219,9 | 219,8 |
| 6 | 43,5 | 43,1 |
| 7 | 74,7 | 74,3 |
| 8 | 36,4 | 36,6 |
| 9 | 30,7 | 30,9 |
| 10 | 23,6 | 22,5 |
| 11 | 27,6 | 32,3 |
| 12 | 57,4 | 61,3 |
| 13 | 54,6 | 61,7 |
| 14 | 31,7 | 32,4 |
| 15 | 76,8 | 76,9 |
| 16 | 137,4 | 137,5 |
| 17 | 120,1 | 120,0 |
| 18 | 152,1 | 152,1 |
| 19 | 116,3 | 116,2 |
| 20 | 165,0 | 165,1 |
| 21 | 20,4 | 19,7 |
| 22 | 21,6 | 21,5 |
| 23 | 14,1 | 13,7 |
| 24 | 17,1 | 17,1 |
| 25 | 15,6 | 15,7 |
| 26 | 19,1 | 19,0 |
| 27 | | 22,7 |

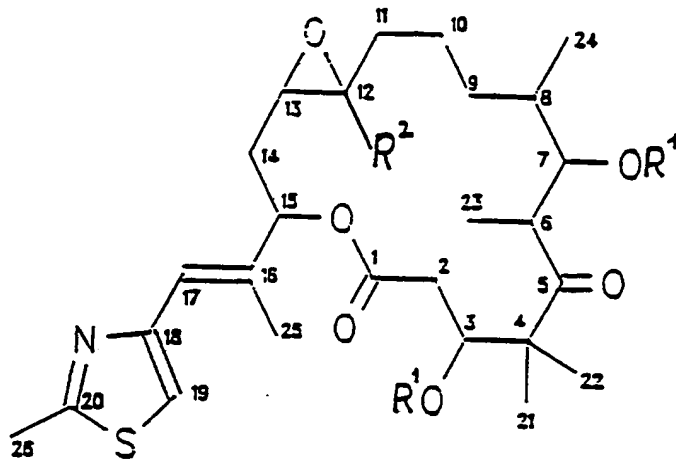
*) Zuordnung vertauschbar

Anwendungsbeispiel

Nach bekannten Methoden (T. Meyer, U. Renegass, D. Fabbro, E. Alteri, J. Rösel, M. Müller, G. Caravatti & A. Matter: A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and in vitro anti-proliferative as well as in vivo anti-tumor activity. Int. J. Cancer 1989, 43, 851-6) wird Epothilon A auf die Hemmung der T-24 Zelllinie untersucht. Es wird ein IC_{50} Wert von $< 0.05 \mu M$ ermittelt.

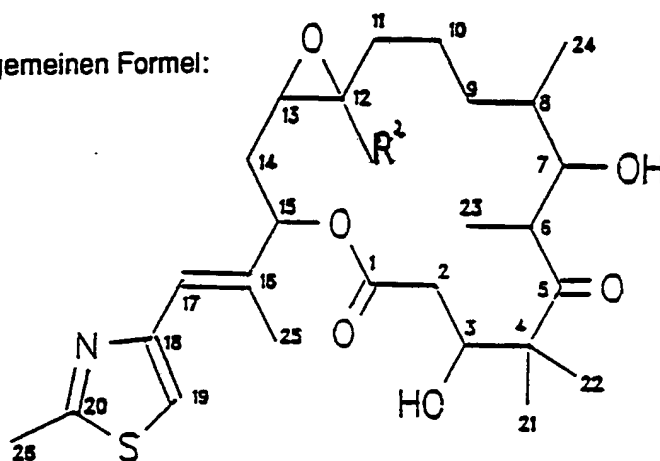
Patentansprüche

1. Epothilone der allgemeinen Formel:



worin R¹ Wasserstoff, C₁-C₄-Alkyl, C₁-C₄-Acyl, Li⁺, K⁺, Na⁺, 1/2 Mg²⁺ oder 1/2 Ca²⁺ bedeutet und R² Wasserstoff oder eine Methylgruppe darstellt.

2. Epothilone der allgemeinen Formel:



worin R² Wasserstoff oder Methyl ist.

3. Epothilon, **gekennzeichnet** durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

| ¹ H-NMR-Daten | | | ¹³ C-NMR-Daten | |
|--------------------------|------|-----|---------------------------|-------|
| Atom | | | Atom | |
| 2a | 2,4 | dd | 1 | 170,5 |
| 2b | 2,52 | dd | 2 | 39,1 |
| 3 | 4,19 | dd | 3 | 73,2 |
| 6 | 3,2 | m | 4 | 53,0 |
| 7 | 3,78 | dd | 5 | 219,9 |
| 8 | 1,73 | m | 6 | 43,5 |
| 9a | 1,4 | m | 7 | 74,7 |
| 9b | 1,52 | m | 8 | 36,4 |
| 10a | 1,4 | m | 9 | 30,7 |
| 10b | 1,4 | m | 10 | 23,6 |
| 11a | 1,42 | m | 11 | 27,6 |
| 11b | 1,7 | m | 12 | 57,4 |
| 12 | 2,9 | ddd | 13 | 54,6 |
| 13 | 3,01 | ddd | 14 | 31,7 |
| 14a | 1,85 | ddd | 15 | 76,8 |
| 14b | 2,11 | ddd | 16 | 137,4 |
| 15 | 5,41 | dd | 17 | 120,1 |
| 17 | 6,6 | s | 18 | 152,1 |
| 19 | 6,99 | s | 19 | 116,3 |
| 21* | 1,08 | s | 20 | 165,0 |
| 22* | 1,35 | s | 21* | 20,4 |
| 23 | 1,15 | d | 22* | 21,6 |
| 24 | 0,93 | d | 23 | 14,1 |
| 25 | 2,05 | s | 24 | 17,1 |
| 26 | 2,69 | s | 25 | 15,6 |
| | | | 26 | 19,1 |

*) Zuordnung vertauschbar

$C_{26}H_{39}NO_6S$ [493]

FAB-MS (neg. Ionen): 492.25 für $(M - H)^-$

UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Intran:

ν : 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979 cm^{-1}

DC: $R_F = 0,75$

DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120 °C,
braune Anfärbung

HPLC: $R_t = 5,4$ min

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7 μm , Merck:

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

4. Epothilon, *gekennzeichnet* durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

| ¹ H-NMR-Daten | | | ¹³ C-NMR-Daten | |
|--------------------------|------|-----|---------------------------|--|
| Atom | | | Atom | |
| 2a | 2,22 | dd | 1 | 170,5 |
| 2b | 2,53 | dd | 2 | 39,4 |
| 3 | 4,24 | dd | 3 | 72,9 |
| 6 | 3,28 | m | 4 | 53,2 |
| 7 | 3,75 | dd | 5 | 219,8 |
| 8 | 1,73 | m | 6 | 43,1 |
| 9a | 1,4 | m | 7 | 74,3 |
| 9b | 1,5 | m | 8 | 36,6 |
| 10a | 1,4 | m | 9 | 30,9 |
| 10b | 1,4 | m | 10 | 22,5 |
| 11a | 1,42 | m | 11 | 32,3 |
| 11b | 1,7 | m | 12 | 61,3 |
| 12 | - | | 13 | 61,7 |
| 13 | 2,8 | dd | 14 | 32,4 |
| 14a | 1,9 | ddd | 15 | 76,9 |
| 14b | 2,1 | ddd | 16 | 137,5 |
| 15 | 5,41 | dd | 17 | 120,0 |
| 17 | 6,6 | s | 18 | 152,1 |
| 19 | 6,99 | s | 19 | 116,2 |
| 21* | 1,05 | s | 20 | 165,1 |
| 22* | 1,36 | s | 21* | 19,7 |
| 23 | 1,15 | d | 22* | 21,5 |
| 24 | 0,92 | d | 23 | 13,7 |
| 25 | 2,05 | s | 24 | 17,1 |
| 26 | 2,69 | s | 25 | 15,7 |
| 27 | 1,28 | s | 26 | 19,0 |
| | | | 27 | 22,7 (R ¹ = CH ₃) |

*) Zuordnung vertauschbar

$C_{27}H_{41}NO_6S$ [507]

FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für $(M - H)^-$

UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtan:

ν = 3400; 2958; 2931, 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977 cm^{-1}

DC: R_F = 0,75

DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm
2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120 °C,
braune Anfärbung

HPLC: R_t = 6,3 min

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7 μm , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

5. Verfahren zum Herstellen von Epothilonen nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß man den Stamm So ce90

- in einem Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen und Mineralsalze enthaltenden Medium kultiviert,
- entweder während der Kultivierung des Stammes oder anschließend ein Adsorberharz zusetzt,
- die Fermenterbrühe abtrennt,
- die Epothilone aus dem Adsorberharz eluiert und
- die Eluate direkt oder über weitere Reinigungsschritte von dem/den Lösungsmittel(n) befreit,
- und gegebenenfalls über Hochdruck/Niederdruckchromatographie und/oder Umkristallisation die verschiedenen Epothilone aufreinigt und voneinander trennt.

6. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren Epothilonen gemäß einem der voranstehenden Ansprüche oder eines oder mehrerer dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

7. Mittel nach Anspruch 6, dadurch **gekennzeichnet**, daß es ein Fungizid oder Fungistatikum ist.

8. Therapeutisches Mittel, das insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken kann, bestehend aus einem oder mehreren Epothilonen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder diese Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/02656

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. ⁵ C07D 493/04; C12P 17/18; A01N 43/90; A61K 31/425
 //(C07D493/04,313:00,303:00)(C12P17/18,C12R1:00)
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. ⁵ C07D; C12P; A01N; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 93, No. 7, 18 August 1980, Columbus, Ohio, US; abstract No. 72218v, Y. SHIMAUCHI ET AL. 'Deltamycin antibiotics' page 1025; see abstract & JP, A, 54 038 113 (SANRAKU-OCEAN CO.) 19 November 1979, compound with CN: 74226-44-1 ----- | 1 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 11 February 1993 (11.02.93)

Date of mailing of the international search report
 25 February 1993 (25.02.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 92/02656

| | | |
|--|---|--|
| I. KLASSEIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶ | | |
| Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Kl. 5 C07D493/04; C12P17/18; A01N43/90; A61K31/425 //(C07D493/04, 313:00, 303:00)(C12P17/18, C12R1:00) | | |
| II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE | | |
| Recherchierte Mindestprüfstoff ⁷ | | |
| Klassifikationssystem | Klassifikationssymbole | |
| Int.Kl. 5 | C07D ; C12P ; A01N ; A61K | |
| Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸ | | |
| III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹ | | |
| Art. ⁹ | Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹² | Betr. Anspruch Nr. ¹³ |
| A | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 93, no. 7, 18. August 1980, Columbus, Ohio, US; abstract no. 72218v, Y. SHIMAUCHI ET AL. 'Deltamycin antibiotics' Seite 1025 ; siehe Zusammenfassung & JP,A,54 038 113 (SANRAKU-OCEAN CO.) 19. November 1979 Verbindung mit CN: 74226-44-1 ----- | 1 |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div> | | |
| IV. BESCHEINIGUNG | | |
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <div style="text-align: center; font-weight: bold;">11. FEBRUAR 1993</div> | | Abschlusssdatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center; font-weight: bold;">25. 02. 93</div> |
| Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center; font-weight: bold;">EUROPAISCHES PATENTAMT</div> | | Unterschrift des bevollmächtigten Beamteten <div style="text-align: center; font-weight: bold;">VOYIAZOGLU D.</div> |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.